



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

500 05 Hradec Králové, Heyrovského 1203, Česká republika,

<http://www.faf.cuni.cz>

tel. +420495067111, fax +420495518002

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Katedra: farmaceutické chemie a kontroly léčiv	Na akademický rok: 2010/2011
Jméno příjmení:	István Fűri
Studijní program:	farmacie
Vedoucí diplomové práce:	doc. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.
Název diplomové práce:	<b>Příprava a in vitro testování bispyridiniových inhibitorů cholinesteras - vliv funkčních skupin.</b>
Název diplomové práce v angličtině:	<b>Preparation and in vitro testing of bispyridinium inhibitors of cholinesterases - influence of functional groups</b>
Zásady pro vypracování:	<p>Teoretická část práce bude sepsána po prostudování literatury související se zadanou problematikou. Experimenty budou prováděny v laboratořích Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv, případně laboratořích Katedry toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, kde bude práci diplomanta řídit školitel-specialista PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D. Dosažené výsledky budou kriticky zhodnoceny v diskusi. Závěrečná úprava diplomové práce bude provedena pod vedením doc. Opletalové tak, aby rozsah a členění diplomové práce odpovídaly požadavkům kladeným na práce farmaceuticko-chemického charakteru na Farmaceutické fakultě UK.</p>

Seznam odborné literatury:

Chemical Abstracts

Beilstein's Handbuch der organischen Chemie

počítačové databáze (Medline, Web of Science)

originální časopisecká, knižní a patentová literatura

Vymětal, J.: Bibliografické citace dle ČSN ISO 690. Chem. Listy 2001, 95, 431 - 438

Vymětal, J.: Bibliografické citace dle ČSN ISO 690 - oprava chyb. Chem. Listy 2001, 95, 683 - 684

Doporučení redaktorům odborných a popularizačních časopisů přírodovědeckého zaměření, autorům vysokoškolských i středoškolských přírodovědných učebnic a tvůrcům odborných právních textů s touto tematikou. Chem. Listy. 2004, 98, 943 - 949

Datum zadání diplomové práce: 15. 11. 2009

Termín odevzdání diplomové práce: 15. 5. 2011

doc. RNDr. Jiří Klimeš, CSc.

vedoucí katedry

Prof. PharmDr. Alexandr Hrabálek, CSc.

děkan fakulty

V Hradci Králové dne: 2009-11-30

UNIVERZITA KARLOVA V PRAHE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKEJ CHÉMIE A KONTROLY LIEČIV



**Príprava a *in vitro* testovanie bispyridiniových inhibítorov  
cholinesteras - vplyv funkčných skupín**

**DIPLOMOVÁ PRÁCA**

**Hradec Králové**

**2011**

**István Fűri**

*Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zoznamu použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.*

***Diplomová práca vznikla za podpory grantu SVV-2011-263-001.***

*Ďakujem pani doc. RNDr. Veronike Opletalovej, Ph.D. a pánovi PharmDr. Kamilovi Musílkovi, Ph.D. za pomoc, podporu, trpezlivosť a za cenné rady pri vypracovávaní tejto diplomovej práce.*

*Ďalej ďakujem pani V. Hronové za prevedenie elementárnych analýz a doc. PharmDr. J. Kunešovi, CSc. za zmeranie NMR spektier.*

# Obsah

Zoznam skratiek .....	8
1 Ciel' práce.....	9
2 Teoretická časť .....	9
2.1 Myasthenia Gravis.....	9
2.2 Cholinesterasy .....	10
2.3 Štruktúra OF .....	11
2.4 Absorpcia OF .....	11
2.5 Mechanizmus účinkov OF .....	12
2.6 Metabolizmus OF .....	13
2.7 Otrava OF .....	14
2.8 Antidota pre terapiu otravy OF .....	15
2.8.1 Anticholinergiká .....	15
2.8.2 Diazepam.....	16
2.8.3 Reaktivátory cholinesteras.....	16
2.8.4 Profylaxia proti otrave OF .....	17
2.9 Terapia onemocnenia myasthenia gravis .....	19
3 Syntetická časť .....	21
3.1 Obecná syntetická časť .....	21
3.2 Príprava biskvartérnych solí .....	22
3.3 Určenie inhibičných parametrov.....	41
3.3.1 Postup merania .....	42
3.3.2 Výsledky merania inhibičnej aktivity.....	43
4 Diskusia .....	45
5 Záver.....	46
6 Zoznam použitej literatúry .....	47

## ABSTRAKT

V rámci mojej diplomovej práce som sa zaoberal syntézou a *in vitro* testovaním bispyridiniových inhibítorov cholinesteras. Bispyridiniové inhibítory boli pripravené s 8 až 12 uhlíkovým a s naftylovým spojovacím reťazcom a pripravené látky mali karbamoylovú, karbamidovú alebo acetylovú skupinu v *para* polohe na pyridinovém kruhu.

V ďalšom kroku nasledovalo *in vitro* testovanie inhibičnej aktivity látok voči AChE a BChE. Inhibičná aktivita bola meraná fotochemicky modifikovanou Ellmanovou metódou. Ako štandardy boli použité BW-284c51 (pre AChE) a ethopropazín (pre BChE).

Látky s karbamoylovou a acetylovou funkčnou skupinou vykazovali vyššiu inhibičnú aktivitu na AChE ako zlúčeniny s karboxylovou funkčnou skupinou. Karboxylová funkčná skupina sa neosvedčila ani pri inhibícii BChE.

## ABSTRACT

In my thesis I was concerned with synthesis and *in vitro* testing of bispyridinium inhibitors of cholinesterases. Bispyridinium inhibitors were prepared with 8 to 12 carbon chain linkers and naphthyl chain linker with carbamoyl, carbamide or acetyl group in *para* position in the pyridine ring.

In the next step, inhibitory activity of the compounds against AChE and BChE was determined *in vitro*. The inhibitory activity was measured using modified Ellman's photochemical method. BW-284c51 (for AChE) and ethopropazine (for BChE) were used as standards.

Substances with carbamoyl and acetyl functional group showed higher AChE inhibitory activity than compounds with carboxyl functional group. Carboxyl functional group was not suitable for inhibitory activity against BChE, too.

## Zoznam skratiek

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AChEI	inhibítor acetylcholinesterasy
BuChE	butyrylcholinesterasa
BuChEI	inhibítor butyrylcholinesterasy
ChE	cholinesterasa
CYP	cytochróm P 450
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DTNB-5,5'	dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
Glu	glutamin
His	histidin
K <sub>d</sub>	disociačná konštanta
M	muskarínový receptor
MG	myasthenia gravis
mAChR	muskarínový receptor pre acetylcholín
MeCN	acetonitril
nAChR	nikotínový receptor pre acetylcholín
NMR	nukleárna magnetická rezonančná spektroskopia
NPL	nervovo paralytické latky
NT	neurotransmitter
OF	organofosforové zlučiny
Phe	fenylalanin
SD	smerodatná odchýlka
Ser	serin
TLC	tenkovrstvová chromatografia
Trp	tryptofan



# 1 Cieľ práce

Cieľom diplomovej práce je syntéza bispyridiniových inhibítorov cholinesteras a skúmanie vplyvu funkčných skupín na ich biologickú aktivitu. Táto skupina látok by mala v prvom rade slúžiť k terapeutickým účelom pri MG alebo ako profylaxia pri intoxikácii NPL.

Budú pripravené bispyridiniové inhibítory s 8 až 12-ti uhlíkovým a s naftylovým spojovacím reťazcom a pripravené látky budú mať karbamoylovú, karbamidovú alebo acetylovú skupinu v *para*-polohe na pyridinovém kruhu.

## 2 Teoretická časť

### 2.1 *Myasthenia Gravis*

MG je vzácne autoimunitné nervovo svalové ochorenie väčšinou spôsobené protilátkami, ktoré sú tvorené proti acetylcholinovým receptorom vo svaloch (AChRs). Strata AChRs vedie k defektom v neurosmuskulárnom prenose a prejavuje sa ako svalová slabosť a únava.

V počiatočnom štádiu sa MG dá liečiť inhibítormi acetylcholinesterasy (AChEI), ktoré zlepšujú neuromuskulárny prenos. Periférne zosilnenie je dosiahnuté použitím kvartérne nabitých molekúl, lebo nabité molekuly ťažšie prestupujú cez hematoencefalickú bariéru. Štruktúra AChEI sa modifikovala, aby bol dosiahnutý optimálny pomer medzi inhibíciou AChE a možnými vedľajšími účinkami.

Estery karbámovej kyseliny, pyridiniové a piperidiniové soli, biskvartérne pyridiniové a heterogénne kvartérne inhibítory sú diskutované ako molekuly s najpriaznivejším účinkom. Dostatok molekúl ukázalo porovnateľnú inhibičnú aktivitu s komerčnými štandardmi (pyridostigmín, neostigmín).(1)

Organofosforové zlúčeniny (OF), sú umele vytvorené zlúčeniny používané v poľnohospodárstve, priemysle i v medicíne, ale takisto zneužívané ako bojové chemické látky. Prvé zlúčeniny boli vyvinuté ako pesticídy (parathion, chlorpyrifos, atď.). Ďalej boli vyvinuté vysoko toxické deriváty, ktoré našli uplatnenie v armáde – nervovo paralytické látky (NPL; sarin, soman, tabun, VX atď.). OF pôsobia toxicky na nervový systém s inhibíciou dôležitého enzýmu acetylcholinesterasy. Inhibovaná AChE nemôže hydrolyzovať acetylcholín pri synaptickom prenose. Dôsledkom toho nastane cholinergná kríza prejavujúca sa paralýzou dýchacích svalov a to vedie k smrti. Bispyridiniové inhibítory by sa dali použiť ako účinná profylaxia pred otravou OF s tým, že by bránili AChE pred ireverzibilnou inhibíciou.(2, 3, 4)

## **2.2 Cholinesterasy**

V ľudskom tele existuje viac typov cholinesteras, ktoré sa líšia tkanivovou distribúciou, substrátovou afinitou a fyziologickými funkciami. Hlavnými sú acetylcholinesterasa (EC 3.1.1.7, AChE), ktorá sa vyskytuje v nervovom systéme a taktiež vo vonkajšej membráne erytrocytov, a plazmová butyrylcholinesterasa (EC 3.1.1.8, BChE) – enzým prítomný v plazme, v pečeni, v cerebrospinálnej tekutine a v gliových bunkách. Pri normálnych fyziologických podmienkach AChE vykonáva rozklad ACh, ktorý je chemickým mediátorom zodpovedným za nervové impulzy v cholinergnej sieti. BChE je cirkulujúci glykoproteín v plazme, jeho fyziologická funkcia nie je úplne známa. BChE sa vyskytuje vo viac ako 40-tich genetických variantoch líšiacich sa citlivosťou voči substrátom.(5)

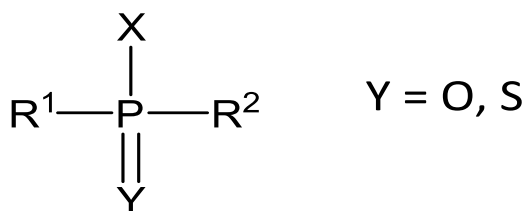
OF a karbamáty sú najdôležitejšie inhibítory AChE často nazývané aj anticholinesterasami. V prítomnosti inhibítorov je AChE postupne inhibovaná a nie je schopná rozkladať ACh na cholin a na kyselinu octovú.(6)

Aktívne miesto AChE má dve podjednotky: esteratickú a anionickú. Esteratickú podjednotku tvorí katalytická triáda zložená z aminokyselín serinu (Ser), histidinu (His) a glutaminu (Glu). Anionická podjednotka sa skladá z tryptofanu (Trp), fenylalanínu (Phe) a tyrosínu (Tyr). Anionická podjednotka interaguje s kladne nabitou

trimethylamoniovou skupinou ACh a správne orientuje substrát pri interakcii s aktívnym miestom enzýmu.(7)

## 2.3 Štruktúra OF

Najčastejšie sa jedná o organické zlúčeniny kyseliny fosforečnej a kyseliny fosfonovej, alebo o ich thioanalógy odvodené od kyseliny thiofosforečnej a thiofosfonovej. Obecnú chemickú štruktúru nám ukazuje Schraderov vzorec pre OF.  $R^1$  a  $R^2$  môžu byť vodík, alkyl, cykloalkyl, alkyloxo, alkylthio, alebo dialkylamidová skupina. Substituent X býva halogén, kyano, alkylthio skupina, alebo zbytok organickej alebo anorganickej kyseliny.(2)



štruktúra OF

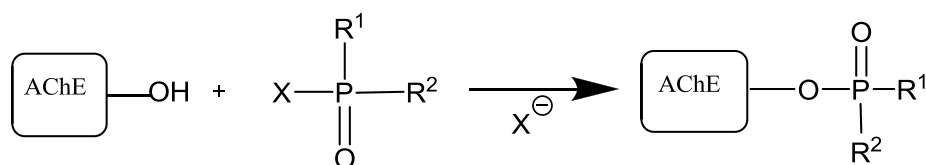
## 2.4 Absorpcia OF

OF v kvapalnej forme sú absorbované cez neporušenú kožu a cez sliznicu. Existuje viacero dôkazov, že expozícia OF v kvapalnej forme (napríklad VX) môže vytvoriť depo v koži. Tým sa predlží uvoľňovanie do systémovej cirkulácie a môže spôsobiť že OF „prežije“ antidotum aplikované intramuskulárnym bolusom.

Výpar OF sa neabsorbuje cez kožu vo veľkom množstve, ale je dostačujúci na vyvolanie miózy. Absorpcia pár pľúcami je rýchla a absorbuje sa 80 % inhalovanej pary. Pri pohybu, keď sa respiračný minútový objem zvýši, percentuálna absorpcia OF sa významne nemení.(8)

## 2.5 Mechanizmus účinkov OF

Základným mechanizmom účinkov OF je zásah do cholinergného nervového systému cestou inhibície AChE. Enzým vytvorí s OF prechodný komplex, ktorý je charakterizovaný disociačnou konštantou  $K_d$ . Následne sa odštiepi časť molekuly, odstupuje skupina X a výsledkom je fosforylovaný alebo fosfonylovaný enzým. Ten je stabilný a aktivita enzýmu sa preto obnovuje veľmi pomaly. Počas rozpadu inhibovaného enzýmu AChE je v časovom intervale od niekoľko hodín až do niekoľkých dní. Táto inhibícia AChE je ireverzibilná a spontánne odštiepenie OF prebieha pomalšie ako syntéza enzýmu *de novo*. Celý proces zhrňuje schéma1.(9)



**inhibícia AChE organofosforovým inhibítorom**

OF sú anticholinesterasami a ich toxické pôsobenie je dosiahnuté dlhotrvajúcou inhibíciou AChE v sieti acetylcholinu v tele. Akútna toxicita je popísaná v nasledujúcej tabuľke, kde sú presne popísané telesné príznaky otravy spôsobené OF.(10)

Príznaky otravy OF			Vážnosť otravy	Aktivita AChE v erythrocytoch (%)
Muskarínové	Nikotínové	Centrálne		
Nauzea, zvracanie, salivácia, diarea,		Bolesti hlavy, závrate, ospalosť, úzkosť	mierne	>40
mióza	Zášklby skeletárnej svaloviny	Ataxia, psychózy, tremor, dysartria, nezreteľná reč	priemerné	20-40
Neúmyselná defekácia, močenie	Svalová slabosť, únava, znížený šľachový reflex, paralýza diafragmy a dýchacích svalov	Kóma, kŕče, depresia, dýchanie	časté	<20

## 2.6 Metabolizmus OF

Metabolizmus OF sa deje na multienzýmovom systéme CYP 450. Prvá fáza metabolizácie OF zahŕňa 6 hlavných reakcií:

- (1) Oxidatívna desulfurácia: metabolizácia tiofosfátovej skupiny na toxickú oxonovú skupinu (to je vlastne aktivácia thiofosfátovej skupiny) napr. u parathionu, malathionu.

- (2) Oxidatívna *N*-dealkylácia: napr. u dimethoátu, fosfamidonu, dikrotofosu
- (3) Oxidatívna *O*-dealkylácia: napr. u chlorfenvinfosu
- (4) Oxidácia thioetheru: u fenthionu, disulfotonu
- (5) Oxidácia bočného alkylového reťazca: u diazinonu, fenitrothionu

Druhá fáza metabolických reakcií predstavuje konjugáciu OF s endogénnymi látkami, akými sú sulfáty a glukuronáty. OF sú detoxikované účinkom:

- (1) Karboxylesteras: tabun, sarin, soman, malathion
- (2) Fosforylfosfatas: tabun, sarin, soman, paraoxon
- (3) Glutathionovým redox systémom: paraoxon, fenitrothion, diazinon, chlorfenvinphos(11)

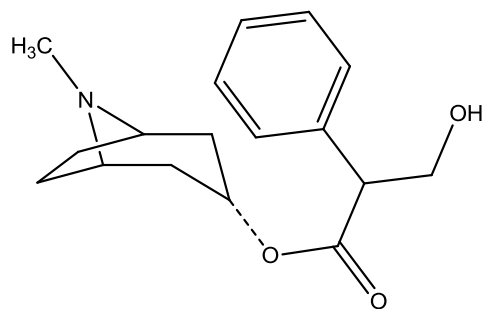
## **2.7 Otrava OF**

Znaky a príznaky akútnej otravy cholinergnými činiteľmi sú predvídateľné z ich biochemických AChE aktivít. Tri typy príznakov sa môžu prejavovať na muskarínových, na nikotínových receptoroch, alebo centrálne. Doba účinku je určená hlavne vlastnosťami zlúčenín; liposolubilitou; stabilitou OF-AChE komplexu; schopnosťou reaktivovať sa reaktivátormi AChE. Len OF obsahujúce P=O väzbu (priame inhibítory) sú schopné inhibovať AChE. Tie, ktoré majú P=S skupinu (nepriame inhibítory) musia byť metabolicky aktivované na oxony, aby mohli inhibovať AChE. Zmena v akútnej toxicite je spôsobená rôznou chemickou štruktúrou, mierou spontánnej reaktívácie a s tzv. „agingem“ (neenzymatická časom závislá strata jednej alkoxylovej skupiny z centrálného fosforového atómu). Polčas „agingu“ je klinicky dôležitý údaj. Polčas „agingu“ soman-AChE komplexu sú 2-4 minúty. Polčas „agingu“ sarin-AChE komplexu je 5-12 hodín (len 5 % enzýmu sa spontánne reaktivuje). Polčas „agingu“ tabun-AChE komplexu je okolo 46 hodín.(2-4, 10-13)

## 2.8 Antidota pre terapiu otravy OF

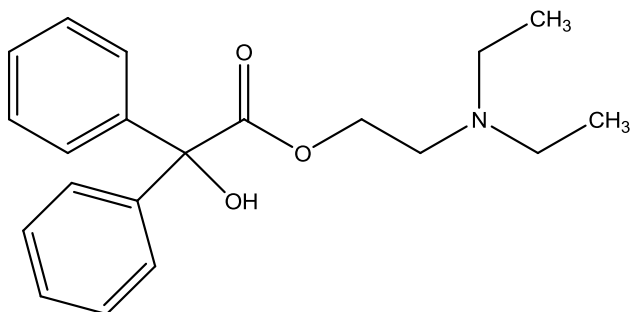
### 2.8.1 Anticholinergiká

Atropín pôsobí blokováním muskarínových receptorov, takže ACh sa nemôže uvoľniť do synapsií. Preto je atropín prvotným liekom používaným pri akútnej otrave OF. Atropín-sulfát v kombinácii s jedným zo štandardných pyridiniových oxímov bol používaný v tradičnej terapii pri akútnej otrave NPL a taktiež pri akútnej otrave OF pesticídmi. Atropín zmierňuje nasledujúce príznaky pri otrave OF: potenie, salivácia, výtok z nosa, slzenie, nauzea, zvracanie, diarea a môže pomôcť pri bradykardii a pri dýchacej depresii dilatovaním bronchov. Neviaže sa na nikotínové receptory, preto nemôže zmierňovať príznaky pôsobené aktiváciou nikotínových receptorov.(11, 14, 15)



**atropín**

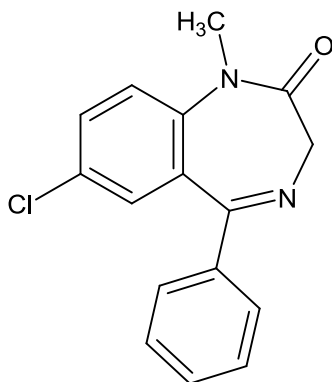
Dajú sa používať aj iné anticholinergiká, napr. benaktyzín.



**benaktyzín**

### 2.8.2 *Diazepam*

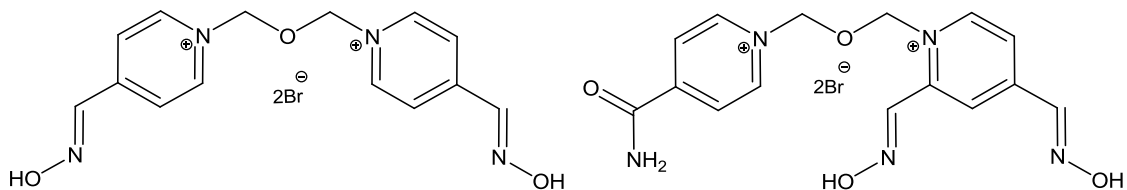
Diazepam je dobre známy benzodiazepín používaný pri kŕčoch a svalových záškľboch pri otrave OF. Diazepam spôsobuje hyperpolarizáciu neurónov, ktoré potom nie sú citlivé na depolarizáciu, ktorú navodí ACh. Kombinácia atropínu s diazepamom je efektívnejšia pre zníženie mortality pri otrave OF ako samotný atropín alebo oxím.(16)



**diazepam**

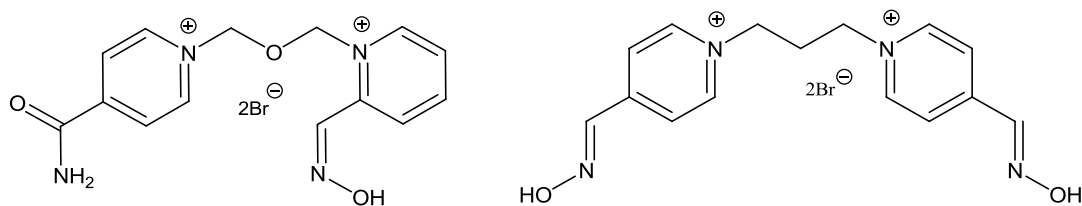
### 2.8.3 *Reaktivátory cholinesteras*

Reaktivátory cholinesteras vyvinuté od 50-tych rokov 20. storočia predstavujú veľký krok dopredu v terapii otravy OF. Hydroxylamín bola prvá zlúčenina schopná reaktivovať komplex AChE-OF. Nasledovali efektívnejšie oxímy, ktoré boli objavené Daviesom a Greenom (pralidoxím v roku 1956). Tento oxím ukazujú efekt pri zvieracích pokusoch, kde komplex AChE-OF starne rýchle (pri intoxikácii somanom). Bolo vyvinutých viacero bispyridinových oxímov ako obidoxím (Lüh-6), HLö-7, asoxím (HI-6), trimedoxím.(8)



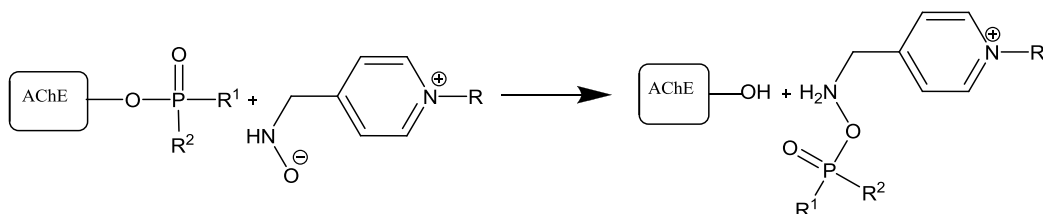
**obidoxím (Lüh-6), HLö-7**





**asoxím (HI-6), trimedoxím**

Hlavným mechanizmom účinku reaktivátorov AChE je odštiepenie zbytku OF na hydroxylovej skupine serinu v aktívnom mieste AChE. Kladne nabitá časť reaktivátora je orientovaná k anionickému miestu. Oxímová skupina potom nukleofilne napadá inhibovanú časť enzýmu. Vzniká prechodný komplex reaktivátor-inhibitor-enzým, ktorý sa následne rozpadá za odstúpenia regenerovaného enzýmu. Fosforylovaný alebo fosfonylovaný oxím, vzniknutý v priebehu reaktívácie, sa môže stať silným inhibítorom a reinhibovať regenerovaný enzým. Reinhibícia AChE môže prebiehať, len pokiaľ fosforylovaný oxím inhibuje AChE rýchlejšie, než dochádza k eliminácii, alebo k rozkladu na netoxické produkty.(10, 17-19) Mechanizmus reaktívácie zjednodušene popisuje schéma:



**reaktívacia AChE**

#### **2.8.4 Profylaxia proti otrave OF**

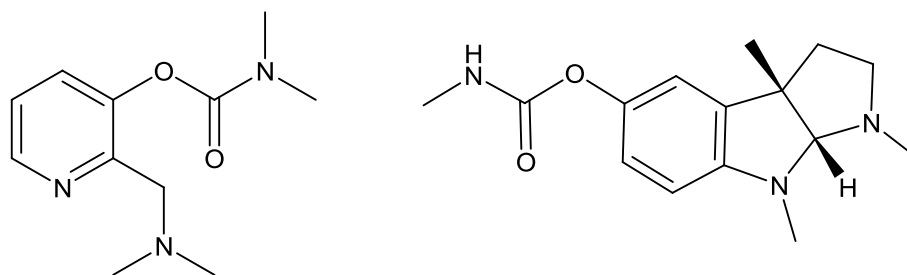
Termín profylaxia proti otrave znamená, že prostriedok je užívaný v relatívne krátkom časovom intervale pred expozíciou OF (väčšinou sa OF dostane do organizmu cez kožnú bariéru a cez dýchacie cesty) bez neskoršej aplikácie antitoxických látok. Profylaktické prostriedky pôsobia niekoľkými mechanizmami. (2, 20-23)

### ➤ Ochrana AChE pred ireverzibilnou inhibíciou

Bránením AChE voči inhibícii môžeme dosiahnuť, že v organizme je dostatok AChE a to je základná požiadavka pre normálnu funkciu organizmu. To sa dá dosiahnuť použitím reverzibilných inhibítorov AChE (primárne karbamáty), ktoré sú schopné inhibovať AChE reverzibilne a po dekarbamylácii AChE zaistí dostatok aktívneho enzýmu.

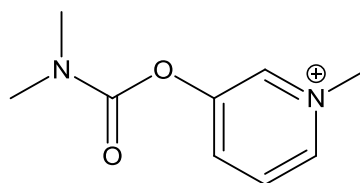
Výsledky sú závislé na podmienkach experimentu, ale protektívny účinok fyzostigmínu, aminostigmínu, pyridostigmínu a ostatných karbamátov voči inhibícii AChE (predovšetkým vyvolané somanom) boli a sú demonštrované.(24)

Predovšetkým fyzostigmín a aminostigmín vykazujú dobrú profylaktickú účinnosť (majú lepší centrálny efekt).(25, 26)



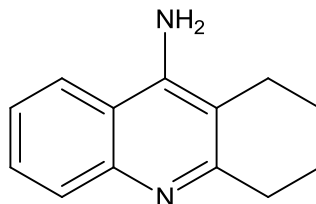
**aminostigmín, fyzostigmín**

Pyridostigmin sa rýchle vstrebáva pri perorálnom podaní. Maximálna inhibícia je dosiahnutá za 2 až 3 hodiny po podaní a trvá dlhšiu dobu ako 8 hodín. Inhibičný polčas je okolo 20 hodín. Na základe týchto výsledkov bol pyridostigmin predstavený v niektorých armádach ako profylaktický liek proti NPL. Jeho profylaktický efekt sa zvyšuje so zvyšujúcou sa dávkou, ale vyššie dávky spôsobujú vystupňovanie vedľajších účinkov.(27)



**pyridostigmín**

Boli preštudované aj inhibítory s odlišnou štruktúrou od karbamátov. Zo zlúčenín primárne sa viažucich na anionické aktívne miesto enzýmu – takrín, jeho 7-methoxy derivát (7-MEOTA) a huperzín A boli experimentálne študované *in vitro* a *in vivo* a boli považované za potenciálne využiteľné liečivá v profylaxii intoxikácií NPL.(27)



**takrín**

➤ **Antagonizácia účinkov vyvolaných nahromadeným acetylcholínom**

Antagonizácia účinkov je dosiahnutá použitím reaktivátorov cholinesteras v kombinácii s atropínom a diazepamom. Táto kombinácia účinne zabraňuje prejav somatických príznakov.(22, 23, 27)

➤ **Zníženie koncentrácie OF v organizme použitím enzýmov,**

Špecifické enzýmy schopné odbúrať OF sú karboxylesterasy, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa a fosfotriesterasy. Tieto enzýmy metabolizujú OF zlúčeniny a v dôsledku toho zmierňujú intoxikáciu a somatické prejavy.(21-23, 27)

## ***2.9 Terapia onemocnenia myasthenia gravis***

MG je autoimunitné ochorenie sprostredkované protilátkami proti postsynaptickej membráne na neuromuskulárnom spoji. Najčastejšie protilátky sú smerované proti nikotínovým acetylcholinovým receptorom (nAChR), pričom ostatné zložky postsynaptickej membrány môžu byť taktiež postihnuté. Znížený neuromuskulárny prenos spôsobuje bolestivú slabosť a únavu priečne pruhovaného svalstva.(28)

Periférne inhibítory AChE sú liečivá prvej línie pri včasnej liečbe MG, keď je ešte počet receptorov pre acetylcholin dostačujúci.(29) Tieto látky zosilňujú pôsobenie AChE tým, že zabraňujú hydrolýze acetylcholínu a tým sa zvyšuje koncentrácia acetylcholínu v synaptickej štrbine. Pri včasnej liečbe sa používajú AChEI karbamátového typu ako pyridostigmín-bromid a neostigmín-bromid. Pyridostigmín-bromid má lepšiu znášanlivosť ako neostigmín-bromid.(30) Vedľajším účinkom sú gastrointestinálne ťažkosti, srdcová arytmia a zvýšená bronchiálna sekrécia.(31)

Štruktúrne symetrickou zlúčeninou je biskvartérny inhibítor ambenónium-dichlorid. Tá zlúčenina je preferovaná z toho dôvodu, že má jednu z najlepších schopností inhibovať AChE (v sub nM rozsahu).(32)

Ambenónium-dichlorid produkuje viac muskarínových vedľajších účinkov s porovnaním s karbamátmi. Je výhodnejší kvôli predĺženému pôsobeniu, ktoré prináša lepší terapeutický efekt v noci v porovnaní so zlúčeninami s krátkym pôsobením. Biskvartérna štruktúra zabraňuje prechodu cez HEB po perorálnom alebo po intravenóznom podaní.(33)

Selektívne pôsobiace látky majú značnú výhodu v tom, že pôsobia len na AChE a organizmus má možnosť s BChE metabolizovať iné toxické látky ako, napr. kokaín.(34)

## 3 Syntetická časť

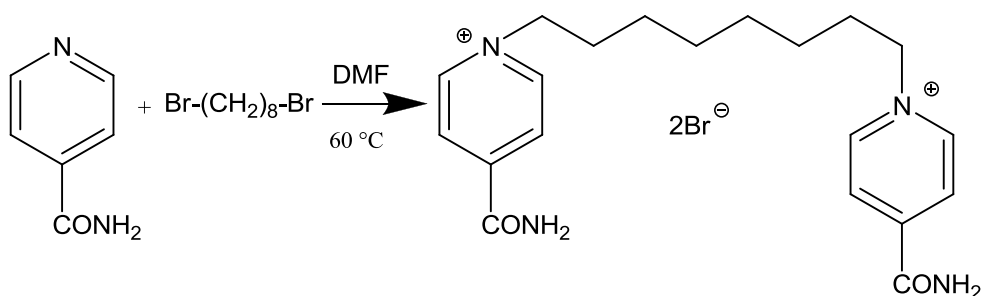
### 3.1 *Obecná syntetická časť*

Použité rozpúšťadlá (MeCN, acetón, DMF) a chemikálie boli dodané firmami Sigma-Aldrich a Fluka a boli používané bez ďalšieho prečistenia. Reakcie boli monitorované TLC (DC-Alufolien Cellulose F, Merck, Nemecko) pri používaní mobilnej fázy BuOH-CH<sub>3</sub>COOH-H<sub>2</sub>O 5:1:2 a detekované Dragendorffovým činidlom. Teploty topenia boli merané na bodotávku PHMK 05 (VEB Kombinat Nagema, Radebeul) a nie sú korigované. NMR spektrá boli merané na Varian Mercury-VxBB 300 (<sup>1</sup>H 300 MHz, <sup>13</sup>C 75 MHz, Palo Alto CA, USA). Chemické posuny pre <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C spektrá sú uvedené v ppm (δ) v pomere k signálu rozpúšťadla (DMSO – δ 2.50 pre <sup>1</sup>H; δ 39.43 pre <sup>13</sup>C; D<sub>2</sub>O s prídavkom acetónu – δ 2.219 pre <sup>1</sup>H; δ 30.89 pre <sup>13</sup>C). Signály sú uvedené ako s (singlet) d (doublet) t (triplet) a m (multiplet). Elementárna analýza sa robila na prístroji EA 1110 CHNS instrument (CE Instruments, Milano, Taliansko). ESI-MS boli merané s použitím hmotnostného spektrometra – Systém HP1100 HPLC dodala firma Agilent Technologies (Waldbronn, Nemecko). Skladá sa z vákuového splynovača G1322A, kvartérnej pumpy G1311A, autosamplera G1313A a kvadrupólového hmotnostného spektrometra MSD1456 VL vybaveného zdrojom elektropray-ionizácie. Dusík pre hmotnostný spektrometer bol získaný z dusíkového generátora Whatman 75-720. Dáta boli odčítané v pozitívnom iontovom módu s ESI sondou s napätím 4000 V. Tlak rozprašovaného plynu bol nastavený na 35 psig. Teplota sušiaceho plynu bola 335 °C a prietok 13 l/min.

### 3.2 Príprava biskvartérnych solí

#### 1-01

1,1'-(oktan-1,8-diyl)bis(4-karbamoylpyridin-1-ium)-dibromid



Postup prípravy: Izonikotínamid (0.5 g; 4 mmol) bol rozpustený v DMF (10 ml). Potom bol pridaný 1,8-dibromoktan (0.34 ml; 1,8 mmol). Reakcia bežala 102 hodín pri 60 °C. Reakčná zmes bola schladená na laboratórnu teplotu, bol pridaný nadbytok acetónu (50 ml) a bola uchovávaná v chladničke cez noc. Produkt bol odfiltrovaný za zníženého tlaku. Nasledovala rekryštalizácia z horúceho MeCN. Bola vykonaná TLC a čistota produktu bola overovaná NMR.

Postup prípravy prvej série látok (1-01 až 1-05) je totožný.

Molekulová hmotnosť produktu: 516.27

Výťažok: 37 %

Teplota topenia: 258-260 °C

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 9.32 (d, 4H, *J* = 5.8 Hz, H-2,2',6,6'), 8.71 (s, 2H, CONH<sub>2</sub>), 8.46 (d, 4H, *J* = 5.8 Hz, H-3,3',5,5'), 8.29 (s, 2H, CONH<sub>2</sub>), 4.66 (t, 4H, *J* = 7.4 Hz, N-CH<sub>2</sub>), 1.99-1.83 (m, 4H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.35-1.18 (m, 8H, N-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>).

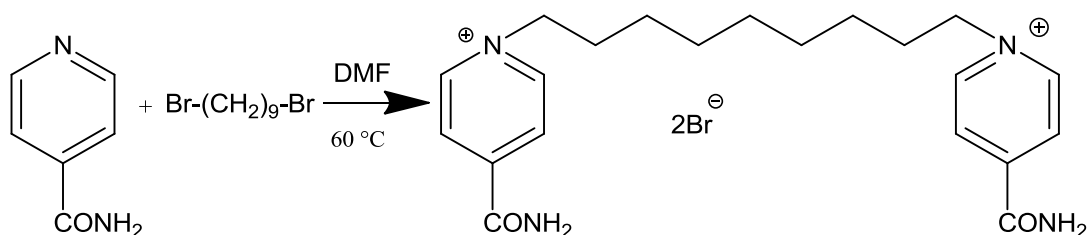
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 163.26, 148.02, 145.64, 125.77, 60.64, 30.53, 28.06, 25.18.

ESI-MS: *m/z* [M]<sup>2+</sup> 178 (kalkulovaný pre [C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> 178)

EA: vypočítané hodnoty 46.53 % C, 5.47 % H, 10.85 % N; namerané hodnoty 46.93 % C, 5.79 % H, 10.79 % N

## 1-02

1,1'-(nonan-1,9-diyl)bis(4-karbamoylpyridin-1-ium)-dibromid



Molekulová hmotnosť: 530.30

Výťažok: 28 %

Teplota topenia: 237-238 °C

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 9.31 (d, 4H, *J* = 5.8 Hz, H-2,2',6,6'), 8.71 (s, 2H, CONH<sub>2</sub>), 8.46 (d, 4H, *J* = 5.8 Hz, H-3,3',5,5'), 8.29 (s, 2H, CONH<sub>2</sub>), 4.66 (t, 4H, *J* = 7.4 Hz, N-CH<sub>2</sub>), 1.99-1.83 (m, 4H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.36-1.16 (m, 10H, N-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 163.27, 148.01, 145.65, 125.78, 60.68, 30.58, 28.46, 28.21, 25.26.

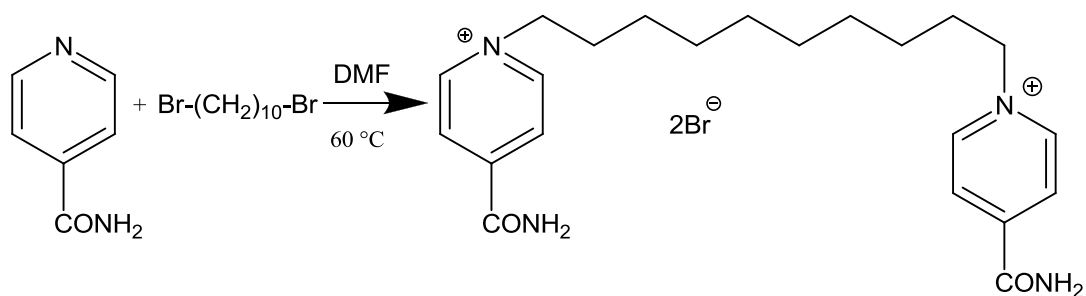
ESI-MS: *m/z* [M]<sup>2+</sup> 185 (kalkulovaný pre [C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> 185)

EA: vypočítané hodnoty 47.56 % C, 5.70 % H, 10.57 % N; namerané hodnoty 47.71 % C, 6.11 % H, 10.42 % N



### 1-03

1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(4-karbamoylpyridin-1-ium)-dibromid



Molekulová hmotnosť: 544.32

Výťažok: 27 %

Teplota topenia: 276-278 °C

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 9.32 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.72 (s, 2H, CONH<sub>2</sub>), 8.46 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-3,3',5,5'), 8.29 (s, 2H, CONH<sub>2</sub>), 4.67 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, N-CH<sub>2</sub>), 1.99-1.82 (m, 4H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.36-1.13 (m, 12H, N-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>).

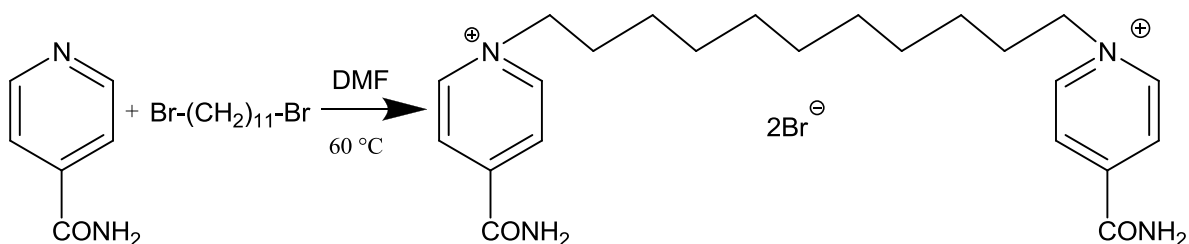
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 163.26, 147.99, 145.64, 125.78, 60.69, 30.61, 28.60, 28.29, 25.29.

ESI-MS:  $m/z$  [M]<sup>2+</sup> 192 (kalkulovaný pre [C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> 192)

EA: vypočítané hodnoty 48.54 % C, 5.93 % H, 10.29 % N; namerané hodnoty 48.60 % C, 6.33 % H, 10.04 % N

## 1-04

1,1'-(undekan-1,11-diyl)bis(4-karbamoylpyridinium)-dibromid



Molekulová hmotnosť: 558.35

Výťažok: 24 %

Teplota topenia: 225-227°C

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 9.31 (d, 4H, *J* = 5.8 Hz, H-2,2',6,6'), 8.72 (s, 2H, CONH<sub>2</sub>), 8.46 (d, 4H, *J* = 5.8 Hz, H-3,3',5,5'), 8.30 (s, 2H, CONH<sub>2</sub>), 4.66 (t, 4H, *J* = 7.4 Hz, N-CH<sub>2</sub>), 2.00-1.83 (m, 4H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.37-1.13 (m, 14H, N-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>).

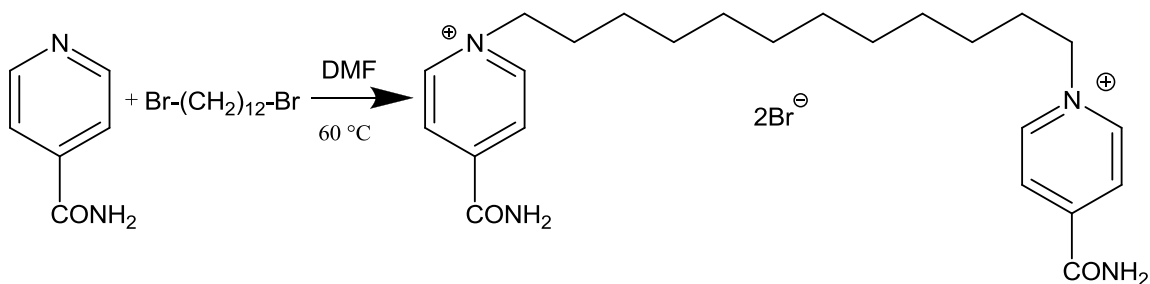
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 163.27, 148.00, 145.64, 125.78, 60.71, 30.61, 28.74, 28.68, 28.33, 25.31.

ESI-MS: *m/z* [M]<sup>2+</sup> 199 (kalkulovaný pre [C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> 199)

EA: vypočítané hodnoty 49.48 % C, 6.14 % H, 10.03 % N; namerané hodnoty 49.02 % C, 6.53 % H, 10.07 % N

## 1-05

1,1'-(dodekan-1,12-diyl)bis(4-karbamoylpyridin-1-ium)-dibromid



Molekulová hmotnosť: 572.38

Výtťažok: 23 %

Teplota topenia: 242-244°C

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 9.30 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.70 (s, 2H,  $\text{CONH}_2$ ), 8.45 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-3,3',5,5'), 8.29 (s, 2H,  $\text{CONH}_2$ ), 4.65 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ), 2.00-1.83 (m, 4H, N- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 1.36-1.13 (m, 16H, N-( $\text{CH}_2$ ) $_2$ -( $\text{CH}_2$ ) $_8$ ).

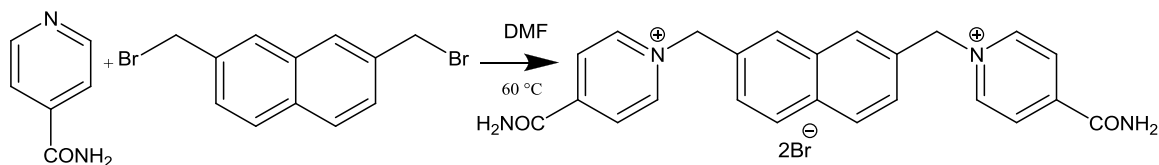
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 163.26, 148.02, 145.64, 125.77, 60.72, 30.59, 28.83, 28.73, 28.35, 25.32.

ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}]^{2+}$  206 (kalkulovaný pre  $[\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_2]^{2+}$  206)

EA: vypočítané hodnoty 50.36 % C, 6.34 % H, 9.79 % N; namerané hodnoty 50.16 % C, 6.73 % H, 9.42 % N

## 2-01

1,1'-(naftalen-2,7-diylbis(methylen))bis(4-karbamoylpyridin-1-ium)-dibromid



Postup prípravy druhej série látok (2-01 až 2-03) je nasledujúci: Pyridinový derivát (4 mmol) bol rozpustený v DMF (10 ml). Potom bol pridaný naftalen-2,7-dimethylbromid (0.57 g; 1.8 mmol). Reakcia bežala 52 hodín pri 60 °C. Reakčná zmes bola schladená na laboratórnu teplotu, bol pridaný nadbytok acetónu (80 ml) a bola uchovávaná v chladničke cez noc. Produkt bol odfiltrovaný za zníženého tlaku. Nasledovala rekryštalizácia z horúceho MeCN. Bola vykonaná TLC a čistota produktu bola overovaná NMR.

Molekulová hmotnosť: 558.27

Výťažok: 37 %

Teplota topenia: >300°C

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 9.46 (d, 4H,  $J$  = 5.8 Hz, H-2,2',6,6'), 8.70 (s, 2H,  $\text{CONH}_2$ ), 8.48 (d, 4H,  $J$  = 5.8 Hz, H-3,3',5,5'), 8.29 (s, 2H,  $\text{CONH}_2$ ), 8.15 (s, 2H, Nph), 8.04 (d, 2H,  $J$  = 8.5 Hz, Nph), 7.73 (d, 2H,  $J$  = 8.5 Hz, Nph), 6.14 (s, 4H, N- $\text{CH}_2$ ).

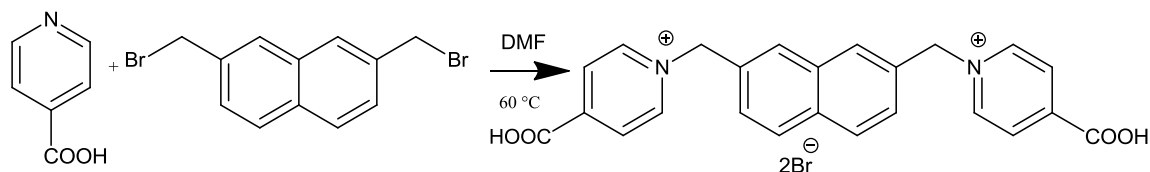
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 163.21, 148.56, 145.84, 132.82, 132.41, 132.31, 128.94, 128.73, 126.97, 126.20, 63.11.

ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}]^{2+}$  199 (kalkulovaný pre  $[\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2]^{2+}$  199)

EA: vypočítané hodnoty 51.63 % C, 3.97 % H, 10.04 % N; namerané hodnoty 50.79 % C, 4.49 % H, 9.78 % N

## 2-02

1,1'-(naftalen-2,7-diylbis(methylen))bis(4-karboxypyridin-1-ium)-dibromid



Molekulová hmotnosť: 560.23

Výťažok: 39 %

Teplota topenia: 263-264 °C

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) δ ppm 9.42 (d, 4H, *J* = 5.8 Hz, H-2,2',6,6'), 8.50 (d, 4H, *J* = 5.8 Hz, H-3,3',5,5'), 8.15 (s, 2H, Nph), 8.04 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, Nph), 7.72 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, Nph), 6.18 (s, 4H, N-CH<sub>2</sub>).

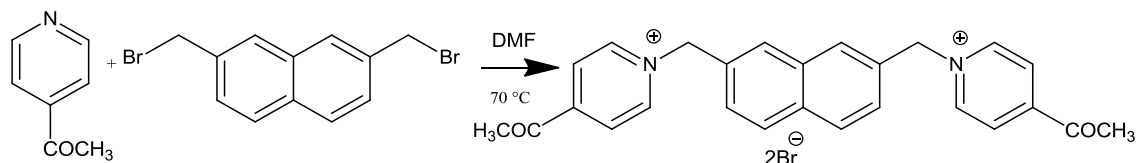
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ ppm 163.41, 146.13, 132.84, 132.39, 132.32, 128.95, 128.77, 127.68, 127.57, 127.02, 63.22.

ESI-MS: *m/z* [M]<sup>2+</sup> 200 (kalkulovaný pre [C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>]<sup>2+</sup> 200)

EA: vypočítané hodnoty 51.45% C, 3.60% H, 5.00% N; namerané hodnoty 51.38% C, 4.28% H, 5.12% N

## 2-03

1,1'-(naftalen-2,7-diylbis(methylen))bis(4-acetylpyridin-1-ium)-dibromid



Molekulová hmotnosť: 556.29

Výťažok: 72 %

Teplota topenia: 282 °C

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 9.56 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.54 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-3,3',5,5'), 8.21 (s, 2H, Nph), 8.04 (d, 2H,  $J = 8.5$  Hz, Nph), 7.75 (d, 2H,  $J = 8.5$  Hz, Nph), 6.21 (s, 4H, N-CH<sub>2</sub>), 2.73 (s, 6H, COCH<sub>3</sub>).

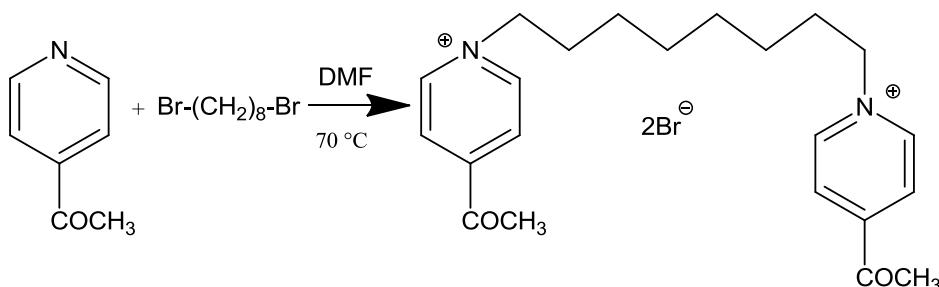
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 195.53, 148.64, 146.32, 132.82, 132.48, 132.28, 128.95, 128.80, 126.97, 126.26, 63.12, 27.40.

ESI-MS:  $m/z$  [M]<sup>2+</sup> 198 (kalkulovaný pre [C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> 198)

EA: vypočítané hodnoty 56.14 % C, 4.35 % H, 5.04 % N; namerané hodnoty 54.44 % C, 4.78 % H, 4.93 % N

### 3-01

#### 1,1'-(oktan-1,8-diyl)bis(4-acetylpyridin-1-ium)-dibromid



Postup prípravy: 1-(pyridin-4-yl)ethanon (0.45 ml; 4 mmol) bol rozpustený v DMF (10 ml). Potom bol pridaný 1,8-dibromoktán (0.34 ml; 1.8 mmol). Reakcia bežala 21 hodín pri  $70^\circ\text{C}$ . Reakčná zmes bola schladená na laboratórnu teplotu, bol pridaný nadbytok acetónu (80 ml) a bola uchovávaná v chladničke cez noc. Produkt bol odfiltrovaný za zníženého tlaku. Nasledovala rekryštalizácia z horúceho ethyl-acetátu. Bola vykonaná TLC a čistota produktu bola overovaná NMR.

Postup prípravy tretej série látok(3-01 až 3-05) je totožný až na reakčnú teplotu, ktorá je u každej reakcie vyznačená.

Molekulová hmotnosť: 514.29

Výťažok: 16 %

Teplota topenia:  $169-172^\circ\text{C}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 9.37 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.51 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-3,3',5,5'), 4.71 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ), 2.75 (s, 6H,  $\text{COCH}_3$ ), 1.99-1.86 (m, 4H, N- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 1.34-1.19 (m, 8H, N-( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>-( $\text{CH}_2$ )<sub>4</sub>).

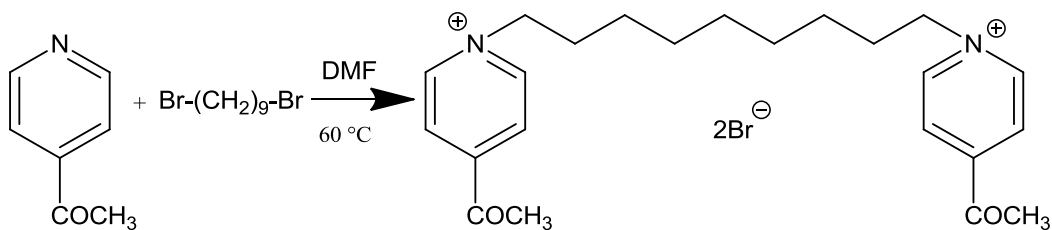
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 195.65, 148.27, 146.14, 125.84, 60.77, 30.66, 28.06, 27.41, 25.18.

ESI-MS:  $m/z$  [ $\text{M}_2+\text{H}$ ]<sup>2+</sup> 177 (kalkulovaný pre [ $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_2$ ]<sup>2+</sup> 177)

EA: vypočítané hodnoty 51.38 % C, 5.88 % H, 5.45 % N; namerané hodnoty 49.45 % C, 6.13 % H, 5.00 % N

### 3-02

1,1'-(nonan-1,9-diyl)bis(4-acetylpyridin-1-ium)-dibromid



Molekulová hmotnosť: 528.32

Výťažok: 24 %

Teplota topenia: amorfná látka(nebola meraná)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 9.37 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.51 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-3,3',5,5'), 4.71 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ), 2.75 (s, 6H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.00-1.84 (m, 4H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ), 1.37-1.17 (m, 10H, N- $(\text{CH}_2)_2\text{-(CH}_2)_5$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 195.67, 148.26, 146.16, 125.85, 60.80, 30.71, 28.48, 28.19, 27.42, 25.25.

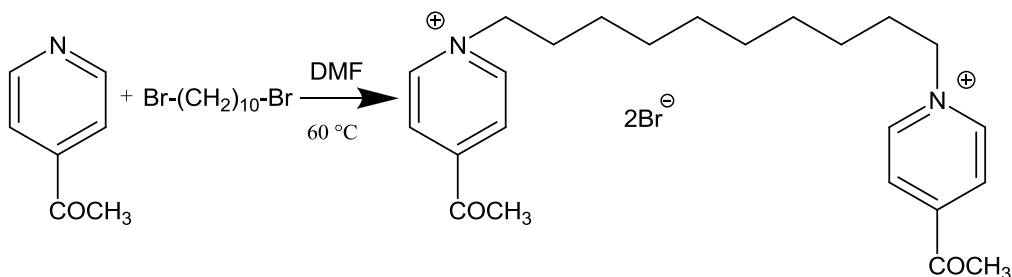
ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}]^{2+}$  184 (kalkulovaný pre  $[\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_2]^{2+}$  184)

EA: neprevedená (amorfná látka)



### 3-03

1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(4-acetylpyridin-1-ium)-dibromid



Molekulová hmotnosť: 542.35

Výťažok: 15 %

Teplota topenia: amorfná látka(nebola meraná)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 9.37 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.51 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-3,3',5,5'), 4.71 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ), 2.75 (s, 6H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.01-1.83 (m, 4H, N- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 1.41-1.13 (m, 12H, N-( $\text{CH}_2$ ) $_2$ -( $\text{CH}_2$ ) $_6$ ).

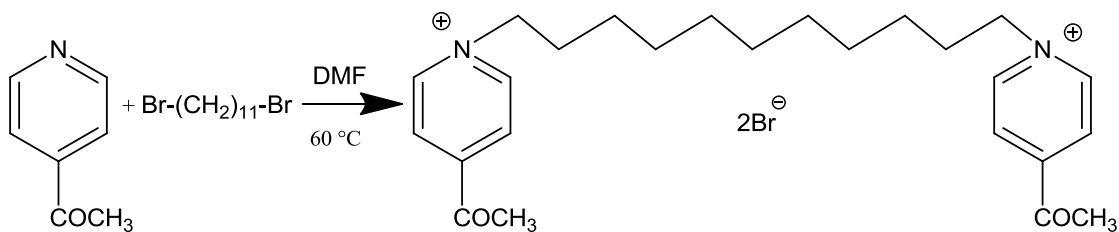
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 195.70, 148.27, 146.18, 125.88, 60.83, 30.77, 28.65, 28.31, 27.45, 25.31.

ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}]^{2+}$  191 (kalkulovaný pre  $[\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_2]^{2+}$  191)

EA: neprevedená(amorfná látka)

### 3-04

1,1'-(undekan-1,11-diyl)bis(4-acetylpyridin-1-ium)-dibromid



Molekulová hmotnosť: 556.37

Výťažok: 15 %

Teplota topenia: amorfná látka(nebola meraná)

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 9.36 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.51 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-3,3',5,5'), 4.70 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ), 2.75 (s, 6H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.01-1.84 (m, 4H, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ), 1.36-1.14 (m, 14H, N-( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>-( $\text{CH}_2$ )<sub>7</sub>).

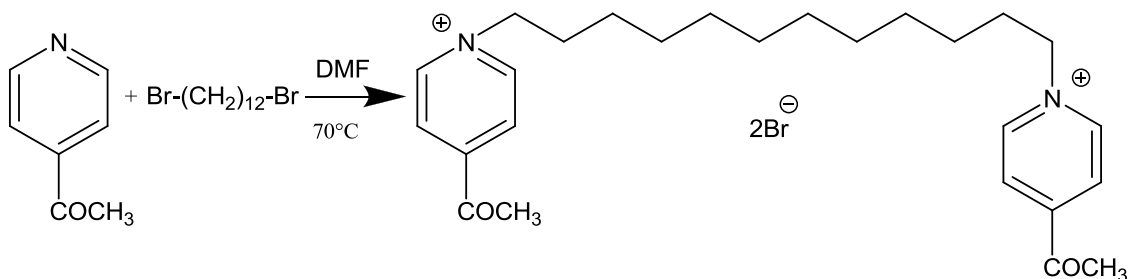
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 195.66, 148.27, 146.15, 125.85, 60.84, 30.74, 28.70, 28.32, 27.41, 25.31.

ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}]^{2+}$  198 (kalkulovaný pre  $[\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_2]^{2+}$  198)

EA: neprevedená(amorfná látka)

### 3-05

1,1'-(dodekan-1,12-diyl)bis(4-acetylpyridin-1-ium)-dibromid



Molekulová hmotnosť: 570.40

Výťažok: 22 %

Teplota topenia:  $80-82^\circ\text{C}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 9.37 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.51 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-3,3',5,5'), 4.71 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ), 2.75 (s, 6H,  $\text{COCH}_3$ ), 1.97-1.86 (m, 4H, N- $\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ), 1.37-1.18 (m, 16H, N- $(\text{CH}_2)_2-(\text{CH}_2)_8$ ).

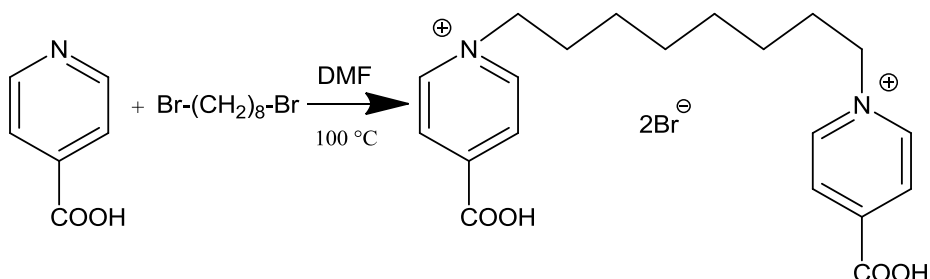
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  ppm 195.65, 148.25, 146.14, 125.84, 60.82, 30.73, 28.81, 28.72, 28.32, 27.40, 25.29.

ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}]^{2+}$  205 (kalkulovaný pre  $[\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_2]^{2+}$  205)

EA: vypočítané hodnoty 54.75 % C, 6.71 % H, 4.91 % N; namerané hodnoty 52.98 % C, 7.06 % H, 4.73 % N

#### 4-01

1,1'-(oktan-1,8-diyl)bis(4-karboxypyridin-1-ium)-dibromid



Postup prípravy: Izonikotínová kyselina (1.0 g; 8 mmol) bola rozpustená v DMF (10 ml). Potom bol pridaný 1,8-dibromoktan (0.67 ml; 3.6 mmol). Reakcia bežala 18 hodín pri  $100\text{ }^\circ\text{C}$ . Reakčná zmes bola schladená na laboratórnu teplotu, bol pridaný nadbytok acetónu (40 ml) a bola uchovávaná v chladničke cez noc. Produkt bol odfiltrovaný za zníženého tlaku. Nasledovala rekryštalizácia z horúceho MeCN. Bola vykonaná TLC a čistota produktu bola overovaná NMR.

Postup prípravy štvrtej série látok (4-01 až 4-05) je totožný.

Molekulová hmotnosť produktu: 518.24

Výťažok : 40 %

Teplota topenia:  $247\text{--}249\text{ }^\circ\text{C}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 9.00 (d, 4H,  $J = 5.8\text{ Hz}$ , H-2,2',6,6'), 8.44 (d, 4H,  $J = 5.8\text{ Hz}$ , H-3,3',5,5'), 4.66 (t, 4H,  $J = 7.4\text{ Hz}$ , N- $\text{CH}_2$ ), 2.07-1.95 (m, 4H, N- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 1.39-1.26 (m, 8H, N-( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>-( $\text{CH}_2$ )<sub>4</sub>).

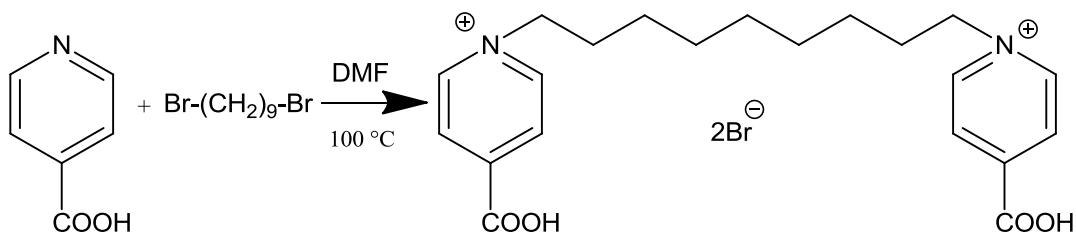
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 215.94, 166.37, 145.98, 128.21, 62.86, 30.88, 28.42, 25.71.

ESI-MS:  $m/z$  [M]<sup>2+</sup> 179 (kalkulovaný pre  $[\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4]^{2+}$  179)

EA: vypočítané hodnoty 46.35 % C, 5.06 % H, 5.41 % N; namerané hodnoty 46.64 % C, 5.65 % H, 5.15 % N

## 4-02

1,1'-(nonan-1,9-diyl)bis(4-karboxypyridin-1-ium)-dibromid



Molekulová hmotnosť: 532.27

Výťažok: 23 %

Teplota topenia: 215-216°C

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 9.00 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.44 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-3,3',5,5'), 4.66 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ), 2.07-1.96 (m, 4H, N- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 1.39-1.19 (m, 10H, N-( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>-( $\text{CH}_2$ )<sub>5</sub>).

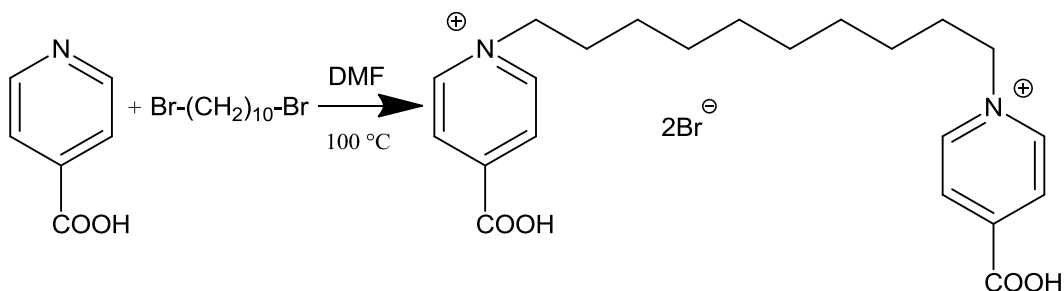
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 215.96, 166.44, 145.97, 128.20, 62.90, 30.89, 28.73, 28.50, 25.76.

ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}]^{2+}$  186 (kalkulovaný pre  $[\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4]^{2+}$  186)

EA: vypočítané hodnoty 47.39 % C, 5.30 % H, 5.26 % N; namerané hodnoty 47.14 % C, 5.89 % H, 4.96 % N

#### 4-03

1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(4-karboxypyridin-1-ium)-dibromid



Molekulová hmotnosť: 546.29

Výťažok: 13 %

Teplota topenia: 263°C

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 9.00 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.45 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-3,3',5,5'), 4.66 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ), 2.07-1.95 (m, 4H, N- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 1.37-1.17 (m, 12H, N-( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>-( $\text{CH}_2$ )<sub>6</sub>).

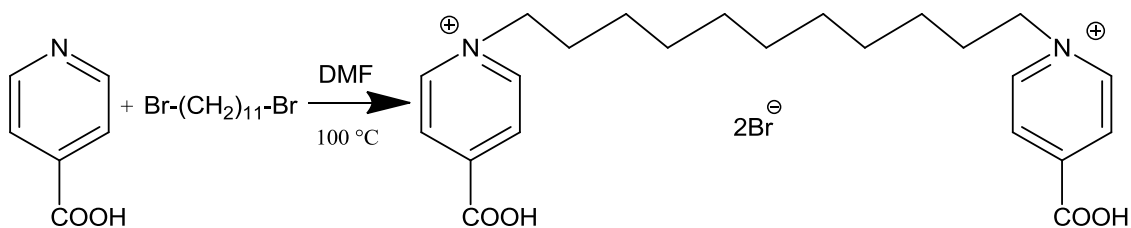
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 215.96, 166.36, 145.99, 128.21, 62.92, 30.88, 28.83, 28.57, 25.77.

ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}]^{2+}$  193 (kalkulovaný pre  $[\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4]^{2+}$  193)

EA: vypočítané hodnoty 48.37 % C, 5.54 % H, 5.13 % N; namerané hodnoty 48.74 % C, 6.09 % H, 4.96 % N

#### 4-04

1,1'-(undekan-1,11-diyl)bis(4-karboxypyridin-1-ium)-dibromid



Molekulová hmotnosť: 560.32

Výťažok: 7 %

Teplota topenia:  $249\text{--}250\text{ }^\circ\text{C}$

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 9.00 (d, 4H,  $J = 5.8\text{ Hz}$ , H-2,2',6,6'), 8.45 (d, 4H,  $J = 5.8\text{ Hz}$ , H-3,3',5,5'), 4.67 (t, 4H,  $J = 7.4\text{ Hz}$ , N- $\text{CH}_2$ ), 2.07-1.94 (m, 4H, N- $\text{CH}_2\text{--CH}_2$ ), 1.40-1.10 (m, 14H, N- $(\text{CH}_2)_2\text{--}(\text{CH}_2)_7$ ).

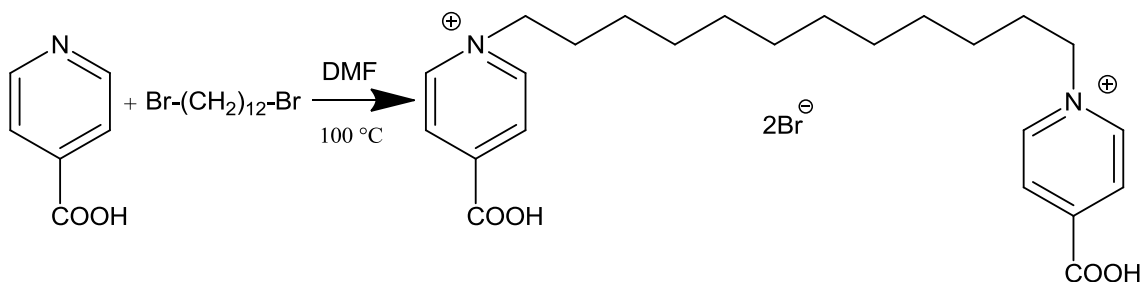
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 215.65, 166.02, 145.70, 127.92, 62.63, 30.88, 30.58, 28.63, 28.31, 25.46.

ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}]^{2+}$  200 (kalkulovaný pre  $[\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4]^{2+}$  200)

EA: vypočítané hodnoty 49.30 % C, 5.76 % H, 5.00 % N; namerané hodnoty 48.59 % C, 6.31 % H, 4.87 % N

#### 4-05

1,1'-(dodekan-1,12-diyl)bis(4-karboxypyridin-1-ium)-dibromid



Molekulová hmotnosť: 574.35

Výťažok: 14 %

Teplota topenia: 252 °C

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 9.01 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-2,2',6,6'), 8.45 (d, 4H,  $J = 5.8$  Hz, H-3,3',5,5'), 4.67 (t, 4H,  $J = 7.4$  Hz, N- $\text{CH}_2$ ), 2.06-1.95 (m, 4H, N- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ ), 1.35-1.08 (m, 16H, N-( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>-( $\text{CH}_2$ )<sub>8</sub>).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  ppm 215.94, 166.37, 146.00, 128.20, 62.92, 30.88, 29.08, 28.99, 28.62, 25.76.

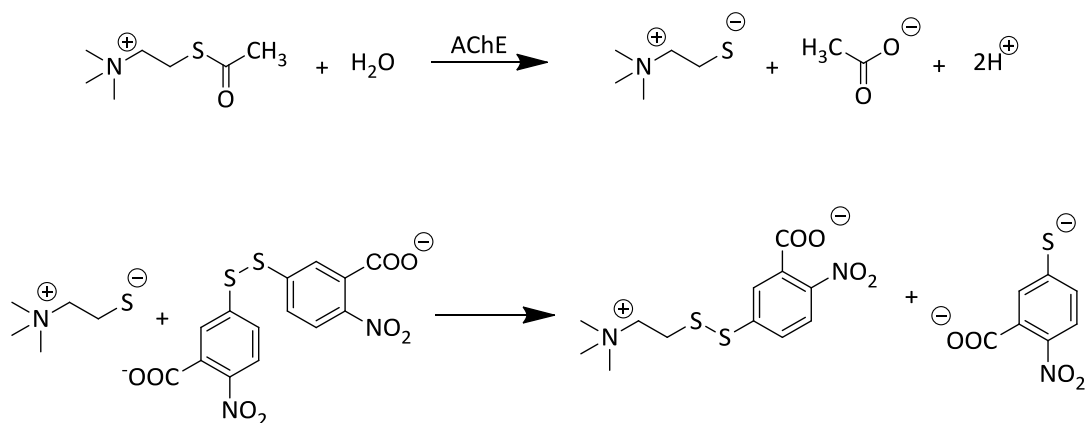
ESI-MS:  $m/z$   $[\text{M}]^{2+}$  207 (kalkulovaný pre  $[\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_4]^{2+}$  207)

EA: vypočítané hodnoty 50.19 % C, 5.97% H, 4.88 % N; namerané hodnoty 50.90 % C, 6.40 % H, 4.88 % N



### 3.3 Určenie inhibičných parametrov

K určeniu inhibičných parametrov bola použitá Ellmanova metóda, čo je spektrofotometrická metóda využiteľná pri veľmi nízkych koncentráciách enzýmov a pri veľmi malom množstve v tkanive. Základným princípom tejto metódy je chemická reakcia, pri ktorej je acetylthiocholin hydrolyzovaný na thiocholin pomocou AChE. Thiocholin je detekovateľný v podobe žltého sfarbenia (5-thio-2-nitrobenzoová kyselina), ktoré vzniká pri reakcii thiocholínu s 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoátovým iontom. (35)



### 3.3.1 *Postup merania*

Inhibičná schopnosť zlúčenín bola meraná na multikanálovom spektrofotometri Sunrise (Tecan, Salzburg, Rakúsko). Boli používané štandardné podmienky teploty a tlaku (25 °C, 100 kPa).

Ellmanova metóda bola prispôbená k meraniu anticholinesterasovej aktivity. Bola používaná štandardná polystyrénová doštička s 96 komorami (Nunc, Roskilde, Dánsko) a humánna rekombinantná AChE. Aktivita enzýmu bola upravená na 0.002 U/μl a bol používaný fosfátový tlmivý roztok o pH 7,4.

Cholinesterasový roztok (5 μl) bol rozpustený vo väčšom objeme tlmivého roztoku (20 μl) a bola pridaná 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina o koncentrácii 0.4 mg/ml (DTBN; 20 μl). Bol pridaný inhibítor o príslušnej koncentrácii (100 mM-1 nM; 5 μl). Zmes bola 5 minút inkubovaná. Bol pridaný 1mM acetylthiocholin-chlorid (ATChCl) vo fosfátovom tlmivom roztoku (20 μl). Po 5-ti minútovej inkubácii nasledovalo automatické trepanie a absorbancia bola meraná pri 412 nm.

Inhibícia v percentách bola vypočítaná podľa nasledujúcej rovnice:

$$I = \left( 1 - \frac{\Delta A_i}{\Delta A_0} \right) \times 100$$

$\Delta A_i$  znamená zmenu absorbancie, ktorá je spôsobená inhibovanou cholinesterasou

$\Delta A_0$  znamená zmenu absorbancie spôsobená intaktnou cholinesterázou, kde namiesto AChEI bol používaný fosfátový tlmivý roztok.

IC<sub>50</sub> bola určená používaním Origin 6.1 (Northampton, MA, USA).(36)

### 3.3.2 Výsledky merania inhibičnej aktivity

Inhibičné aktivity boli namerané prispôbenou Ellmanovou metódou. Ako štandardné inhibítory boli používané BW-284c51 a ethopropazín. Inhibičná aktivita bola meraná na AChE i na BChE. Podľa absorbancie bola vypočítaná  $IC_{50}$  s používaním programu Origin 6.1 (Northampton, MA, USA).

Inhibítor	hAChE $IC_{50} \pm SD$ ( $\mu M$ )	hBChE $IC_{50} \pm SD$ ( $\mu M$ )	SI hBChE/hAChE
BW-284c51	0.03 $\pm$ 0.006	354 $\pm$ 58	11800
ethopropazín	1020 $\pm$ 199	1.6 $\pm$ 0.3	0.002
1-01	9 $\pm$ 2	313 $\pm$ 52	35
1-02	6 $\pm$ 1	176 $\pm$ 29	29
1-03	1.9 $\pm$ 0.4	212 $\pm$ 35	112
1-04	1.7 $\pm$ 0.3	99 $\pm$ 16	58
1-05	0.37 $\pm$ 0.07	130 $\pm$ 22	351
2-01	1.0 $\pm$ 0.2	1040 $\pm$ 174	1040
2-02	255 $\pm$ 50	0	---
2-03	0.6 $\pm$ 0.1	63 $\pm$ 11	105
3-01	2.7 $\pm$ 0.5	39 $\pm$ 7	14
3-02	1.6 $\pm$ 0.3	21 $\pm$ 4	13
3-03	1 $\pm$ 0.9	19 $\pm$ 3	19
3-04	1 $\pm$ 0.9	15 $\pm$ 3	15

3-05	$1.1 \pm 0.2$	$10 \pm 2$	10
4-01	$4990 \pm 973$	$4250 \pm 710$	0.9
4-02	$170 \pm 33$	$195 \pm 33$	1.1
4-03	$100 \pm 20$	0	---
4-04	$98 \pm 19$	$292 \pm 49$	3
4-05	$65 \pm 13$	$88 \pm 15$	1.4

## 4 Diskusia

Inhibičná aktivita bispyridiniových zlúčenín vo veľkej miere závisí na štruktúre. Prvých päť pripravených zlúčenín (1-01, 1-02, 1-03, 1-04, 1-05), ktoré majú v *para*-polohe od kvartérneho dusíka karbamoylovú skupinu, vykazuje významnú aktivitu voči AChE, aj keď nedosahujú účinnosti štandardného inhibítora BW-284c51. Aktivita týchto látok voči BChE je v porovnaní s ethopropazínom zanedbateľná. Najvyššiu inhibíciu AChE vykázala látka 1-05 s dvanásť uhlíkovým alifatickým spojovacím reťazcom. S rastúcim spojovacím reťazcom sa aktivita zvýšila.

Druhá séria látok má naftylový spojovací reťazec. Zlúčenina s karbamoylovou skupinou v *para*-polohe od kvartérneho dusíka (2-01) vykazuje významnú aktivitu na AChE a zanedbateľný vplyv na BChE. Zlúčenina s karboxylovou skupinou v *para*-polohe od kvartérneho dusíka (2-02) významne inhibuje BChE a prakticky nemá vplyv na AChE. Zlúčenina s acetylovou skupinou v *para*-polohe od kvartérneho dusíka (2-03) významne inhibuje AChE a má menší vplyv i na BChE.

Tretia séria látok s acetylovou skupinou v *para*-polohe od kvartérneho dusíka s 8-12 uhlíkovým alifatickým spojovacím reťazcom (3-01, 3-02, 3-03, 3-04, 3-05) vykazuje aktivitu na AChE i BChE. Vyššiu aktivitu vykazuje na AChE. Aktivita na AChE je vyššia a s rastúcim spojovacím reťazcom sa aktivita zvyšuje do 10. a do 11. uhlíku.

Štvrtá séria látok (4-01, 4-02, 4-03, 4-04, 4-05) obsahuje karboxylovú skupinu v *para*-polohe od kvartérneho dusíka. Zlúčenina 4-01 nevykazuje skoro žiadnu aktivitu na AChE ani na BChE. Zlúčenina 4-03 významne inhibuje BChE a má menší vplyv i na AChE. So zväčšujúcim sa spojovacím reťazcom sa aktivita zvyšuje a zlúčenina s 12 uhlíkovým spojovacím reťazcom už mierne inhibuje AChE i BChE. U zlúčeniny s 10 uhlíkovým spojovacím reťazcom (4-03) sa ukázala významná inhibícia BChE a pravdepodobne sa jedná o artefakt ktorý bol zapríčinený chybou merania, pretože žiadna zlúčenina nevykazovala vysokú aktivitu v tejto homologickej rade.

## 5 Záver

Bolo pripravených 18 bispyridiniových inhibítorov cholinesteras. Ich aktivita bola porovnaná s dvomi štandardmi. Ako inhibičný štandard AChE bola zvolená zlúčenina BW-284c51 a ako inhibičný štandard BChE bola zvolená zlúčenina ethopropazín.

Významnú inhibíciu AChE vykazovala séria prvých piatich látok s karbamoylovou funkčnou skupinou a aktivita sa zvyšovala so zväčšujúcim sa spojovacím reťazcom. Vysokú aktivitu vykazovali látky s acetylovou funkčnou skupinou v *para*-polohe na pyridinovom kruhu. Vysokú aktivitu vykazovali i látky s naftylovým spojovacím reťazcom a takisto mali v *para*-polohe buď karbamoylovú, alebo acetylovú funkčnú skupinu.

Významnú aktivitu na BChE vykazovala látka 2-02, ktorá má karboxylovú funkčnú skupinu v *para*-polohe na pyridinovom kruhu a látka 4-03 taktiež s karboxylovou funkčnou skupinou v *para*-polohe. Obi dve látky vykazovali relatívne malú aktivitu na AChE. Tretia séria látok s acetylovou funkčnou skupinou v *para*-polohe vedľa významnej inhibície na AChE a vykazovala aj slabú aktivitu na BChE.

## 6 Zoznam použitej literatúry

1. Komloova, M.; Musilek, K.; Dolezal M.; Gunn-Moore, F.; Kuca K. Structure-activity relationship of quaternary acetylcholinesterase inhibitors – outlook for early myasthenia gravis treatment. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 1810-1824.
2. Bajgar, J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Adv. Clin. Chem.* **2004**, *38*, 151-216.
3. Marrs, T. C. Organophosphate poisoning. *Pharmacol. Ther.* **1993**, *58*, 51-66.
4. Bajgar, J. Nervově paralytické látky. In Patočka et al. (Eds.). 1. vyd. *Vojenská toxikologie*. Grada: Praha, 2004, s. 30-44.
5. Mesulam, M. M.; Guillozet, A.; Shaw, P.; Levey, A.; Duysen, E. G.; Lockridge, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* **2002** *110*, 627-639.
6. Jokanović, M.; Maksimović, M. Abnormal cholinesterase activity: understanding and interpretation. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1997**, *35*, 11-16.
7. Sussman, J. L.; Harel M.; Frolow F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo californica: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **1991**, *253*, 872-879.
8. Maynard, R. L.; Chilcott, R. P. Toxicology of chemical warfare agents. In Ballantyne, B. et al. (Eds.). 3<sup>rd</sup> ed. *General and Applied Toxicology* [online]. John Wiley & Sons: Chicester, NewYork, 2009., Vol. 1, Part 12, pp. 1-37. Dostupné z URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470744307.gat131/pdf>
9. Patočka, J.; Kuča K.; Jun D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. *Act. Med. (Hradec Králové)* **2004**, *47*, 215-228.
10. Jokanović, M.; Stojiljković, M. P. Current understanding of the application of pyridinium oximes as cholinesterase reactivators in treatment of organophosphate poisoning. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *553*, 10-17.

11. Antonijević, B.; Stojiljković, M. P. Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphate poisoning. *Clin. Med. Res.* **2007**, *5*, 71-82.
12. Sidell, F. R. Nerve agents. In *Textbook of Military Medicine, Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*. Zajtcuk R.; Bellamy, R. F. (Eds.), Office of the Surgeon General Department of the Army, USA, 1997, pp. 129-179.
13. Karczmar, A. G. Acute and long lasting central actions of organophosphorus agents. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1984**, *4*, S1-S17.
14. McDonough, J. H; McLeod. C. G., Nipwoda, M. T. Direct micro-injection of soman or VX into the amygdala produces repetitive limbic convulsions and neuropathology. *Brain Res.*, **1987**, *435*, 123-137.
15. Zilker, T. Medical management of incidents with chemical warfare agents. *Toxicology* **2005**, *214*, 221-231.
16. McDonough, J. H, Jr.; McMonagle, J.; Copeland, T.; Zoeffel, D.; Shih, T.-M. Comparative evaluation of benzodiazepines for control of soman-induced seizures. *Arch. Toxicol.* **1999**, *73*, 473-478.
17. Thiermann, H.; Szinicz, L.; Eyer, F.; Worek, F.; Eyer, P.; Felgenhauer, N.; Zilker, T. Modern strategies in therapy of organophosphate poisoning. *Toxicol. Lett.* **1999**, *107*, 233-239.
18. De Jong, L. P.; Ceulen, D. I. Anticholinesterase activity and rate of decomposition of some phosphylated oximes. *Biochem. Pharmacol.* **1978**, *27*, 857-863.
19. Worek, F.; Backer, M.; Thiermann, H.; Szinicz, L.; Mast, U.; Klimmek, R.; Eyer, P. Reappraisal of indications and limitations of oxime therapy in organophosphate poisoning. *Hum. Exp. Toxicol.* **1997**, *16*, 466-472.
20. Bajgar, J.; Fusek, J.; Jun, D.; Kuca, K.; Bartosova, L. Possibility of pharmacological prophylaxis against highly toxic organophosphates. *Chem. Listy* **2007**, *101*, S81-S83.
21. Bajgar, J. Prophylaxis against organophosphorus poisoning. *J. Med. Chem. Def.* **2004**, *1*, 1-16
22. Aas, P. Future considerations for the medical management of nerve-agent intoxications. *Prehosp. Disaster. Med.* **2004**, *18*, 208-216.



23. Patocka, J.; Jun, D.; Bajgar, J.; Kuca, K. Prophylaxis against nerve agent intoxications. *Def. Sci. J.* **2006**, *56*, 775-784.
24. Patocka, J. Effect of pyridostigmine and syntostigmine pretreatment on the inhibition of acetylcholinesterase by *O*-pinacolylmethylphosphonofluoridate. In vitro experiments with rat tissues. *Biomed. Biochim. Acta.* **1989**, *48*, 715-720.
25. Kim, Y. B.; Cheon, K. C.; Hur, G. H.; Phi, T. S.; Choi, S. J.; Hong, D.; Kang, J. K. Effects of combinational prophylactics composed of physostigmine and procyclidine on soman induced lethality, seizures and brain injuries. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2002**, *11*, 15-21.
26. Tuovinen, K.; Hanninen, O. Protection of mice against soman by pretreatment with eptastigmine and physostigmine. *Toxicology* **1999**, *139*, 233-241.
27. Bajgar, J., Fusek, J., Kassa J., Kuca K.; Jun, D. Chemical Aspects of Pharmacological Prophylaxis Against Nerve Agent Poisoning. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 2977-2986.
28. Juel, V. C.; Massey, J. M. Myasthenia gravis. *Orphanet J. Rare Dis.* **2007**, *2*, 44-57.
29. Richman, D. P.; Agius, M. A. Treatment of autoimmune myasthenia gravis. *Neurology* **2003**, *61*, 1652-1661.
30. Juel, V.C.; Massey, J.M. Autoimmune myasthenia gravis: recommendations for treatment and immunologic Modulation. *Curr. Treat. Options Neurol.* **2005**, *7*, 3-14.
31. Massey, J. M. Acquired myasthenia gravis *Neurol. Clin.* **1997**, *15*, 577-595.
32. Hodge, A. S.; Humphrey, D. R.; Rosenberry, T. L. Ambenonium is a rapidly reversible noncovalent inhibitor of acetylcholinesterase, with one of the highest known affinities. *Mol. Pharmacol.* **1992**, *41*, 937-942.
33. Bolognesi, M. L.; Cavalli, A.; Andrisano, V.; Bartolini, M.; Banzi, R.; Antonello, A.; Rosini, M.; Melchiorre, C. *Farmaco* **2003**, *58*, 917-928.
34. Gorelick, D.A. Enhancing cocaine metabolism with butyrylcholinesterase as a treatment strategy. *Drug Alcohol Depend.* **1997**, *48*, 159-165.

35. G. L. Ellman; K. D. Courtney, K D.; Andres, V Jr.; Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**; 7; 88-95.
36. Musilek, K., Roder, J., Komloova, M., Holas, O., Hrabínová, M., Pohanka, M., Dohnal, V., Opletalová, V., Kuca, K., Young-Sik, Jung. Preparation, in vitro screening and molecular modelling of symmetrical 4-tert-butylpyridinium cholinesterase inhibitors—Analogues of SAD-128. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 150-154.